

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 139 076

A2

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑲ Anmeldenummer: 84104063.7

⑳ Anmeldetag: 11.04.84

⑥ Int. Cl.: C 12 N 15/00
C 12 P 21/02, C 12 N 5/00
/(C12N5/00, C12R1:91),
(C12P21/02, C12R1:91)

⑳ Priorität: 11.04.83 DE 3312928

㉑ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.05.85 Patentblatt 85/18

㉒ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI SE

㉓ Anmelder: Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH (GBF)
Mascheroder Weg 1
D-3300 Braunschweig-Stöckheim(DE)

㉔ Erfinder: Mayer, Hubert, Dr.
Grosser Zimmerhof 10
D-3340 Wolfenbüttel(DE)

㉕ Vertreter: Boeters, Hans Dietrich, Dr. et al,
Boeters, Bauer & Partner Thomas-Wimmer-Ring 14
D-8000 München 22(DE)

㉖ Human-Parathyroidhormon (Human-PTH) produzierende Hybridvektoren, Human-Parathyroidhormongen,
eukaryotische Zellen mit dem Hybridvektor und deren Verwendung.

㉗ Die Erfindung betrifft Human-Parathormon produzierende
Hybridvektoren sowie Human-Parathormongen.

0 139 076 A2

BOETERS, BAUER & PARTNERPATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYSTHOMAS-WIMMER-RING 14
D-8000 MÜNCHEN 22**0139076**PAG BOETERS, BAUER & PARTNER
THOMAS-WIMMER-RING 14, D-8000 MÜNCHEN 22DIPLOM-CHM. DR. HANS D. BOETERS
DIPLOM-ING. ROBERT BAUER
MÜNCHENDIPLOM-ING. VINZENZ v. RAFFAY
DIPLOM-CHM. DR. THOMAS FLECK
HAMBURG

TELEFON: (089) 22 78 87

TELEFAX: 5 24 878 m

TELEGRAMME: PROVENTION, MÜNCHEN

11. April 1983

Anmelderin: Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH (GBF), Mascheroder Weg 1,
D-3300 Braunschweig-Stöckheim

Human-Parathormon produzierende Hybridvektoren und Human-
Parathormongen

Human-Parathormon reguliert u.a. den Einbau und Ausbau von
5 Calcium in Knochen.

Aufgabe der Erfindung ist es, biologisches Material zur
Verfügung zu stellen, mit dem Human-Parathormon technisch
hergestellt werden kann.

10

Gemäß einer Ausführungsform wird diese Aufgabe durch einen
in prokaryotischen Zellen klonierbaren Hybridvektor gelöst,
der Human-Parathormon produziert und durch folgende Merk-
male gekennzeichnet ist:

15

(a) einen Promotor,

(b) einen sich an den Promotor anschließenden DNA-Bereich
von 0 bis 1000 und insbesondere 0 bis 200 Basenpaaren,20 (c) eine sich an den DNA-Bereich gemäß (b) anschließende
ribosomale Bindungsstelle,

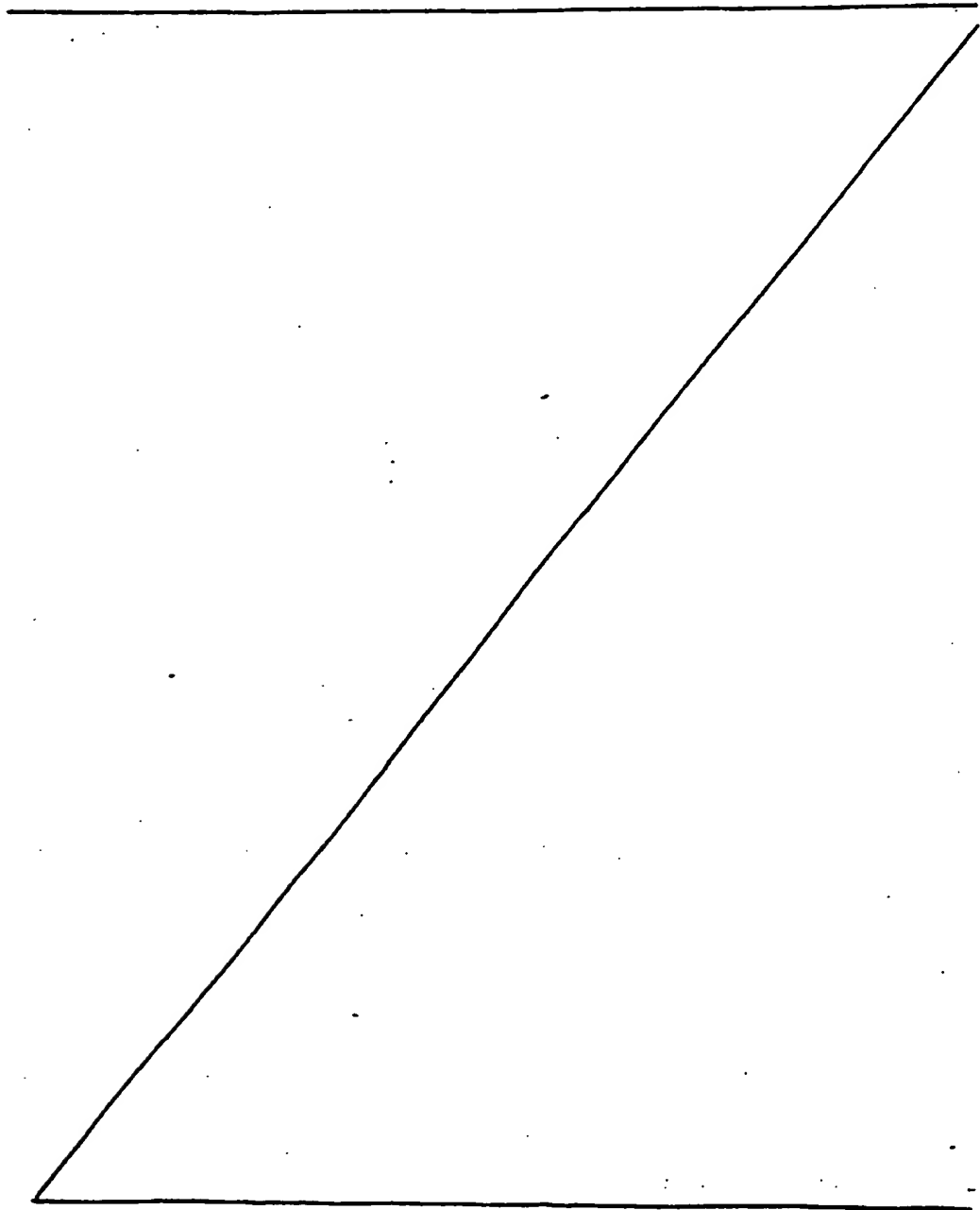
0139076

- 2 -

(d) einen sich an die ribosomale Bindungsstelle anschließenden DNA-Bereich von 4 bis 15 Basenpaaren,

(e) ein sich an den DNA-Bereich gemäß (d) anschließendes Startcodon und

(f) die folgende Human-Parathormon kodierende DNA-Sequenz:



- 3 -

- 3 -

0139076

(84AA)

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
TCT GTG AGT GAA ATA CAG CTT ATG CAT AAC CTG GGA AAA CAT
AGA CAC TCA CTT TAT GTC GAA TAC GTA TTG GAC CCT TTT GTA

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
CTG AAC TCG ATG GAG AGA GTA GAA TGG CTG CGT AAG AAG CTG
GAC TTG AGC TAC CTC TCT CAT CTT ACC GAC GCA TTC TTC GAC

Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala
CAG GAT GTG CAC AAT TTT GTT GCC CTT GGA GCT CCT CTA GCT
GTC CTA CAC GTG TTA AAA CAA CGG GAA CCT CGA GGA GAT CGA

Pro Arg Asp Ala Gly Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp
CCC AGA GAT GCT GGT TCC CAG AGG CCC CGA AAA AAG GAA GAC
GGG TCT CTA CGA CCA AGG GTC TCC GGG GCT TTT TTC CTT CTG

Asn Val Leu Val Glu Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala
AAT GTC TTG GTT GAG AGC CAT GAA AAA AGT CTT GGA GAG GCA
TTA CAG AAC CAA CTC TCG GTA CTT TTT TCA GAA CCT CTC CGT

Asp Lys Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys Ala Lys Ser Gln
GAC AAA GCT GAT GTG AAT GTA TTA ACT AAA GCT AAA TCC CAG T
CTG TTT CGA CTA CAC TTA CAT AAT TGA TTT CGA TTT AGG GTC A

0139076

- 4 -

Als prokaryotische Zellen kommen alle Zellen in Betracht, in denen sich Hybridvektoren mit den angegebenen Merkmalen in technischem Maßstab unter Bildung von Human-Parathormon klonieren lassen. Insbesondere kommt *Escherichia coli* in Betracht. Beispiele für geeignete Promotoren für *E. coli* finden sich beispielsweise bei Sengbusch, P. von, Molekular- und Zellbiologie, Springer-Verlag, Heidelberg etc. 1979. Bei *E. coli* kann die ribosomale Bindungsstelle beispielsweise die folgende DNA-Sequenz aufweisen:

10

AGGA oder GGAG

TCCT CCTC

Ein Beispiel für ein bei *E. coli* verwendbares Startcodon hat die DNA-Sequenz

ATG

TAC

20 Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen in eukaryotischen Zellen klonierbaren und Human-Parathormon produzierenden Hybridvektor gelöst,

(A) der dadurch herstellbar ist, daß man

25

(a) aus Schweine-Nebenschilddrüsen mRNA isoliert,

(b) die isolierte mRNA als ds-cDNA mit Hilfe eines Vektors in *E. coli* kloniert,

(c) aus Pools erhaltener Klone Hybridvektor-DNA isoliert,

30

(d) isolierte Hybridvektor-DNA an einen für jeden Pool eigenen Träger fixiert, gemäß (a) isolierte mRNA anlagert und wieder entfernt, entfernte mRNA in Schweine-Prä-Pro-Parathormon oder Schweine-Parathormon zu übersetzen versucht, gebildetes Schweine-Prä-Pro-Parathormon oder Schweine-Parathormon

- 5 -

0139076

- 5 -

durch Antikörperfällung nachweist und damit gemäß (b) erhaltene Klone ermittelt, die Schweine-Parathormongen-Sequenzen aufweisen, Hybridvektor-DNA ermittelter und Schweine-Parathormongen-Sequenzen aufweisende Klone sequenziert und den oder
5 die Klone identifiziert, die Hybridvektor-DNA mit Schweine-Parathormon kodierender DNA-Sequenz aufweisen,

(e) Hybridvektor-DNA der gemäß (d) identifizierten Klone radioaktiv markiert,

10 (f) mit erhaltener radioaktiv markierter Hybridvektor-DNA eine Human-Genbank screent und

(g) das ermittelte Human-Parathormon in einen in eukaryotischen Zellen klonierbaren Hybridvektor überführt,

(B) und der dadurch gekennzeichnet ist, daß er eine zwischen
15 zwei RI-Schnittstellen liegende DNA-Sequenz, die die folgende DNA-Sequenz umfaßt, oder einen Unterbereich der zwischen den RI-Schnittstellen liegenden DNA-Sequenz aufweist:

0139076

TGTCCTTTAGTTTACTCAGCATCAGCTACTAACATACCTGAACGAAGATCTTGTCTAAGA
ACAGAAATCAAATGAGTCGTCGATGATTGTATGGACTTGCTTCTAGAACAAGATTCT

CATTGTAT
GTAACATA

Intron II ca. 400 bp

	GTG	AAG	Met	Ile	Pro	Ala	Lys	Asp	Met	Ala	Lys	Val	Met
	ATG	ATA	CCT	GCA	AAA	GAC	ATG	GCT	AAA	GTT	ATG		
	CAC	TTC	TAC	TAT	GGA	CGT	TTT	CTG	TAC	CGA	TTT	CAA	TAC

Ile	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Cys	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Asp	Gly	Lys
ATT	GTC	ATG	TTG	GCA	ATT	TGT	TTT	CTT	ACA	AAA	TCG	GAT	GGG	AAA
TAA	CAG	TAC	AAC	CGT	TAA	ACA	AAA	GAA	TGT	TTT	AGC	CTA	CCC	TTT

Ser Val Lys
TCT GTT AAG
AGA CAA TTC

Intron I	Lys	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn
ca. 80 bp	AAG	AGA	TCT	GTG	AGT	GAA	ATA	CAG	CTT	ATG	CAT	AAC
	TTC	TCT	AGA	CAC	TCA	CTT	TAT	GTC	GAA	TAC	GTA	TTG

Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn	Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg
CTG	GGA	AAA	CAT	CTG	AAC	TCG	ATG	GAG	AGA	GTA	GAA	TGG	CTG	CGT
GAC	CCT	TTT	GTA	GAC	TTG	AGC	TAC	CTC	TCT	CAT	CTT	ACC	GAC	GCA

Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro
AAG	AAG	CTG	CAG	GAT	GTG	CAC	AAT	TTT	GTT	GCC	CTT	GGA	GCT	CCT
TTC	TTC	GAC	GTC	CTA	CAC	GTG	TTA	AAA	CAA	CGG	GAA	CCT	CGA	GGA

Leu	Ala	Pro	Arg	Asp	Ala	Gly	Ser	Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Lys	Glu
CTA	GCT	CCC	AGA	GAT	GCT	GGT	TCC	CAG	AGG	CCC	CGA	AAA	AAG	GAA
GAT	CGA	GGG	TCT	CTA	CGA	CCA	AGG	GTC	TCC	GGG	GCT	TTT	TTC	CTT

Asp	Asn	Val	Leu	Val	Glu	Ser	His	Glu	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Ala
GAC	AAT	GTC	TTG	GTT	CAG	AGC	CAT	GAA	AAA	AGT	CTT	GGA	GAG	GCA
CTG	TTA	CAG	AAC	CAA	CTC	TCG	GTA	CTT	TTT	TCA	GAA	CCT	CTC	CGT

Asp	Lys	Ala	Asp	Val	Asn	Val	Leu	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	Gln
GAC	AAA	GCT	GAT	GTG	AAT	GTA	TTA	ACT	AAA	GCT	AAA	TCC	CAG
CTG	TTT	CGA	CTA	CAC	TTA	CAT	AAT	TGA	TTT	CGA	TTT	AGG	GTC

AAA	TGA	AAA	CAG	ATA	TTG	TCA	GAG	TTC	TGC	TCT	AGA	CAG	TGT	AGG
TTT	ACT	TTT	GTC	TAT	AAC	AGT	CTC	AAG	ACG	AGA	TCT	GTC	ACA	TCC

GCA	ACA	ATA	CAT	GCT	GCT	AAT	TCA	AAG	CTC	TAT	TAA	GAT	TTC	CAA
CGT	TGT	TAT	GTA	CGA	CGA	TTA	AGT	TTC	GAG	ATA	ATT	CTA	AAG	GTT

GTG	CCA	ATA	TTT	CTG	ATA	TAA	CAA	ACT	ACA	TGT	AAT	CCA	TCA	CTA
CAC	GGT	TAT	AAA	GAC	TAT	ATT	GTT	TGA	TGT	ACA	TTA	GGT	AGT	GAT

GCC	ATG	ATA	ACT	GCA	ATT	TTA	ATT	GAT	TAT	TCT	GAT	TCC	ACT	TTT
CGG	TAC	TAT	TGA	CGT	TAA	AAT	TAA	CTA	ATA	AGA	CTA	AGG	TGA	AAA

ATT	CAT	TTG	AGT	TAT	TTT	AAT	TAT	CTT	TTC	TAT	TGT	TTA	TTC	TTT
TAA	GTA	AAC	TCA	ATA	AAA	TTA	ATA	GAA	AAG	ATA	ACA	AAT	AAG	AAA

TTA	AAG	TAT	GTT	ATT	GCA	TAA	TTT	ATA	AAA	GAA	TAA	AAT	TCG	ACT
AAT	TTC	ATA	CAA	TAA	CGT	ATT	AAA	TAT	TTT	CTT	ATT	TTA	AGC	TGA

TTT	AAA	CCT	CTC	TTC	TAC	CTT	AAA	ATG	TAA	AAC	AAA	AAT	GTA	ATG
AAA	TTT	GGA	GAG	AAG	ATG	GAA	TTT	TAC	ATT	TTG	TTT	TTA	CAT	TAC

ATC	ATA	AGT	CTA	AAT	AAA	TGA	AGT	ATT	TCT	CAC	TCA	AA
TAG	TAT	TCA	GAT	TTA	TTT	ACT	TCA	TAA	AGA	GTG	AGT	TT

0139076

- 7 -

Beispiele für eukaryotische Zellen, in denen der Hybridvektor klonierbar ist und Human-Parathormon produzieren kann, sind Humanzellen oder Affenzellen, beispielsweise Affennierenzellen.

Schließlich wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch Human-Parathormonen gelöst,

(a) das gemäß den vorstehenden Ausführungen und Anspruch 3 (A) herstellbar ist und

.0 (b) durch die zwischen zwei RI-Schnittstellen liegende DNA-Sequenz gemäß den vorstehenden Ausführungen und gemäß Anspruch 3 (B) oder einen Unterbereich davon gekennzeichnet ist.

15 Zur Produktion von Human-Parathormon ist es auch möglich, das erfindungsgemäße Human-Parathormonen direkt in eukaryotische Zellen zu transformieren.

20 Nachstehend wird die Herstellbarkeit der erfindungsgemäßen Hybridvektoren und des erfindungsgemäßen Human-Parathormons an einem Beispiel und drei Schemata näher erläutert.

Aus frisch geschlachteten Schweinen wurden die Nebenschilddrüsen operiert. Aus diesem Drüsengewebe wurde mRNA isoliert. Die isolierte mRNA wurde als doppelstrangige komplementäre DNA (ds-cDNA) mit Hilfe eines Plasmids in E. coli kloniert. Aus den erhaltenen Hybridklonen wurde die Hybridplasmid-DNA isoliert. Aus den Nebenschilddrüsen isolierte mRNA wurde in 30 einem In-Vitro-Translationssystem in das Schweine-Prä-Pro-Parathormon oder Schweine-Parathormon übersetzt. Das Schweine-Prä-Pro-Parathormon oder Schweine-Parathormon wurde durch Antikörperfällung nachgewiesen. Mit Hilfe einer "Hybrid-Arrested-Translation" konnten die Klone aufgefunden werden, 35 die Schweine-Parathormonsequenzen enthielten. Aus den ermit-

0139076

- 3 -

telten Hybridklonen wurde Hybridplasmid-DNA, die das Schweine-Parathormongen (Schema 1) umfaßte, radioaktiv markiert (nick-translatiert) und zum Screenen von Humangenbänken verwendet. Auf diese Weise ermitteltes Human-Parathormongen wurde durch Subklonieren in einem Plasmid angereichert. Ein auf diese Weise angereichertes Human-Parathormongen wurde sequenziert. Die Sequenz des für die Expression von Human-Parathormon relevanten Abschnittes ist dem Schema 2 zu entnehmen. Die ermittelte Sequenz stimmte mit der bekannten cDNA-Sequenz und mit der bekannten Aminosäuresequenz des Human-Parathormons überein.

Im folgenden wird Schema 3 erläutert. (1) In das weitere Verfahren wurde die zwischen zwei RI-Schnittstellen liegende DNA-Sequenz eingesetzt, die die DNA-Sequenz des Schemas 2 umfaßt. (2) Es wurde nun mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Sau3A das Prä-Pro-PTH-Gen (PTH = Parathormon) vom Gen des reifen 1-84-PTH getrennt. (3) Durch Auffüllen von dATP und dGTP mit dem "Large fragment" der E.-coli-DNA-Polymerase-I und (4) anschließenden Abbau mit S1-Nuklease wurde der verbleibende Einzelstrangrest (GA) der klebrigen Enden (sticky ends) beseitigt, die vom Sau3A-Schnitt herrührten (GATC); dadurch wurde das Codon "TCT" für die Aminosäure 1 (Serin) des Human-PTH rekonstituiert. (5) An dieses in der angegebenen Weise behandelte PTH-DNA-Fragment wurde ein DNA-Adaptor ligiert. Dadurch wurde dem Serin ein Methionin-Codon "ATG" direkt vorgeschaltet. Dieses Codon ist eines der wichtigen Signale für den Start der Synthese von PTH im Mikroorganismus. (6-7) Das in der angegebenen Weise konstruierte PTH-Fragment wurde in die ClaI-Spaltstelle von pBR322 subkloniert. Ausgewählt wurde ein Klon, dessen PTH-Gen vor der HindIII-Spaltstelle des pBR322 im Uhrzeigersinn orientiert war. Dieser PTH-Klon wurde mit HindIII gespalten. (8) Die "sticky ends" dieser Spaltstelle ließen Auffüllreaktionen mit

35

- 9 -

0139076

- 9 -

vier verschiedenen Nukleotiden zu. In Kombination mit dem Abbau durch S1-Nuklease gelangte man zu Fragmenten mit aufgeföüllten Enden (flush ends), deren Entfernung vom ATG-Codon 4 bis 10 Basenpaare betrug. (9) Vor diese Variation an Fragmenten wurden zwei synthetische DNA-Adaptoren ligiert, und zwar /TCCCTAGGGA/+ /TCCCTAGGGA/. Diese Linker enthielten die Sequenz der ribosomalen Bindungsstelle, ein weiteres wichtiges Signal für die Expression im Mikroorganismus. Dadurch entstand weiter eine BamHI-Spaltstelle. Diese war für die Klonierung hinter verschiedenen Promotoren (wie trp, tac, T5) beschriebener Vektoren geeignet.

Die E. coli-Zellen wurden im LB-Vollmedium in Gegenwart von Ampicillin (50 µg/ml) bis zur mittleren logarithmischen Phase angezogen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Suspensionspuffer mit Guanidiniumhydrochlorid (3 M) suspendiert (ungefähr 10^{10} Zellen/ml); danach wurde mit Ultraschall (Sonifier) bis zu einer optischen Dichte (OD_{650}) aufgeschlossen, die etwa 1/3 der optischen Dichte zu Beginn entsprach. Dieser Zellaufschluß wurde abzentrifugiert. Der Überstand enthielt PTH. Das Protein wurde mit 5-prozentigem TCA gefällt und in 0,02 n Salzsäure gelöst. TCA-Reste wurden mit Äther ausgewaschen. Das aus Rohextrakt und nach Extraktion gewonnene PTH war immunologisch gegen Antikörper 1-34, 28-48 und 48-68 wirksam (RIA) und war im Adenylcyclase-Test biologisch aktiv.

Das Human-Parathormongen wurde mit einem Vektor verknüpft (pBR322/SV40-Derivat) und mit Hilfe einer Calciumphosphat-Fällung in Affennierenzellen transformiert. Aus 10^9 Zellen wurde PTH durch Extraktion gewonnen und im RIA getestet.

Außerdem wurde das Human-Parathormongen (lambda-Humanhybrid-DNA) mit dem Thymidinkinasegen von Herpes simplex durch Co-Transformation in T3-Zellen transformiert; aus den Tk^+ -Klonen wurde durch DNA-Hybridisieren die Integration des Human-PTH-Gens identifiziert.

- 10 -

0139076

Schema 1

Asp Thr Val Lys Val Met Val Val Met Leu Ala Ile Cys Phe
GAC ACA GTT AAA GTA ATG GTT GTC ATG CTT GCA ATT TGT TTT
CTG TGT CAA TTT CAT TAC CAA CAG TAC GAA CGT TAA ACA AAA

Leu Ala Arg Ser Asp Gly Lys Pro Val Lys Lys Arg Ser Val
CTT GCA AGA TCA GAT GGG AAG CCT GTT AAG AAG AGA TCT GTG
GAA CGT TCT AGT CTA CCC TTC GGA CAA TTC TTC TCT AGA CAC

Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser
AGT GAA ATA CAG CTT ATG CAT AAC CTG GGC AAA CAC CTG AGC
TCA CTT TAT GTC GAA TAC GTA TTG GAC CCG TTT GTG GAC TCG

Ser Leu Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp
TCT CTG GAG AGA GTG GAA TGG CTG CGA AAG AAG CTG CAG GAT
AGA GAC CTC TCT CAC CTT ACC GAC GCT TTC TTC GAC GTC CTA

Val His Asn Phe Val Val Leu Gly Ala Ser Ile Val His Arg
GTG CAC AAC TTT GTT GTT CTC GGA GCT TCT ATA GTT CAC AGA
CAC GTG TTG AAA CAA CAA GAG CCT CGA AGA TAT CAA GTG TCT

Asp Gly Gly Ser Gln Arg Pro Pro Lys Lys Glu Asp Asn Val
GAT GGT GGT TCC CAG AGA CCC CCA AAA AAG GAA GAC AAT GTC
CTA CCA CCA AGG GTC TCT GGG GGT TTT TTC CTT CTG TTA CAG

Leu Val Glu Ser His Gln Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys
CTA GTT GAG AGC CAT CAA AAA AGT CTC GGA GAA GCA GAT AAA
GAT CAA CTC TCG GTA GTT TTT TCA GAG CCT CTT CGT CTA TTT

Ala Ala Val Gly
GCT GCT GTG GGG
CGA CGA CAC CCC

completed

0139076

TGTCCTTTAGTTTACTCAGCATCAGCTACTAACATACCTGAACGAAGATCTTGTTCTAAGA
ACAGAAATCAAATGAGTCGATGATGATTGTATGGACTTGCTTCTAGAACAAAGATTCT

CATTGTAT
GTAACATA

Intron II ca. 400 bp

				Met	Ile	Pro	Ala	Lys	Asp	Met	Ala	Lys	Val	Met
	GTG	AAG	ATG	ATA	CCT	GCA	AAA	GAC	ATG	GCT	AAA	GTT	ATG	
	CAC	TTC	TAC	TAT	GGA	CGT	TTT	CTG	TAC	CGA	TTT	CAA	TAC	

Ile	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Cys	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Asp	Gly	Lys
ATT	GTC	ATG	TTG	GCA	ATT	TGT	TTT	CTT	ACA	AAA	TCG	GAT	GGG	AAA
TAA	CAG	TAC	AAC	CGT	TAA	ACA	AAA	GAA	TGT	TTT	AGC	CTA	CCC	TTT

Ser Val Lys
TCT GTT AAG
AGA CAA TTC

Intron I		Lys	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn
ca. 80 bp	AAG	AGA	TCT	GTG	AGT	GAA	ATA	CAG	CTT	ATG	CAT	AAC	
	TTC	TCT	AGA	CAC	TCA	CTT	TAT	GTC	GAA	TAC	GTA	TTG	

Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn	Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg
CTG	GGA	AAA	CAT	CTG	AAC	TCG	ATG	GAG	AGA	GTA	GAA	TGG	CTG	CGT
GAC	CCT	TTT	GTA	GAC	TTG	AGC	TAC	CTC	TCT	CAT	CTT	ACC	GAC	GCA

Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro
AAG	AAG	CTG	CAG	GAT	GTG	CAC	AAT	TTT	GTT	GCC	CTT	GGA	GCT	CCT
TTC	TTC	GAC	GTC	CTA	CAC	GTG	TTA	AAA	CAA	CGG	GAA	CCT	CGA	GGA

Leu	Ala	Pro	Arg	Asp	Ala	Gly	Ser	Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Lys	Glu
CTA	GCT	CCC	AGA	GAT	GCT	GGT	TCC	CAG	AGG	CCC	CGA	AAA	AAG	GAA
GAT	CGA	GGG	TCT	CTA	CGA	CCA	AGG	GTC	TCC	GGG	GCT	TTT	TTC	CTT

Asp	Asn	Val	Leu	Val	Glu	Ser	His	Glu	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Ala
GAC	AAT	GTC	TTG	GTT	GAG	AGC	CAT	GAA	AAA	AGT	CTT	GGA	GAG	GCA
CTG	TTA	CAG	AAC	CAA	CTC	TCG	GTA	CTT	TTT	TCA	GAA	CCT	CTC	CGT

Asp	Lys	Ala	Asp	Val	Asn	Val	Leu	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	Gln	
GAC	AAA	GCT	GAT	GTG	AAT	GTA	TTA	ACT	AAA	GCT	AAA	TCC	CAG	TGA
CTG	TTT	CGA	CTA	CAC	TTA	CAT	AAT	TGA	TTT	CGA	TTT	AGG	GTC	ACT

AAA	TGA	AAA	CAG	ATA	TTG	TCA	GAG	TTC	TGC	TCT	AGA	CAG	TGT	AGG
TTT	ACT	TTT	GTC	TAT	AAC	AGT	CTC	AAG	ACG	AGA	TCT	GTC	ACA	TCC

GCA	ACA	ATA	CAT	GCT	GCT	AAT	TCA	AAG	CTC	TAT	TAA	GAT	TTC	CAA
CGT	TCT	TAT	GTA	CGA	CGA	TTA	AGT	TTC	GAG	ATA	ATT	CTA	AAG	GTT

GTG	CCA	ATA	TTT	CTG	ATA	TAA	CAA	ACT	ACA	TGT	AAT	CCA	TCA	CTA
CAC	GGT	TAT	AAA	GAC	TAT	ATT	GTT	TGA	TGT	ACA	TTA	GGT	AGT	GAT

GCC	ATG	ATA	ACT	GCA	ATT	TTA	ATT	GAT	TAT	TCT	GAT	TCC	ACT	TTT
CGG	TAC	TAT	TGA	CGT	TAA	AAT	TAA	CTA	ATA	AGA	CTA	AGG	TGA	AAA

ATT	CAT	TTG	AGT	TAT	TTT	AAT	TAT	CTT	TTC	TAT	TGT	TTA	TTC	TTT
TAA	GTA	AAC	TCA	ATA	AAA	TTA	ATA	GAA	AAG	ATA	ACA	AAT	AAG	AAA

TTA	AAG	TAT	GTT	ATT	GCA	TAA	TTT	ATA	AAA	GAA	TAA	AAT	TCG	ACT
AAT	TTC	ATA	CAA	TAA	CGT	ATT	AAA	TAT	TTT	CTT	ATT	TTA	AGC	TGA

TTT	AAA	CCT	CTC	TTC	TAC	CTT	AAA	ATG	TAA	AAC	AAA	AAT	GTA	ATG
AAA	TTT	GGA	GAG	AAG	ATG	GAA	TTT	TAC	ATT	TTG	TTT	TTA	CAT	TAC

ATC	ATA	AGT	CTA	AAT	AAA	TGA	AGT	ATT	TCT	CAC	TCA	AA		
TAG	TAT	TCA	GAT	TTA	TTT	ACT	TCA	TAA	AGA	GTG	AGT	TT		

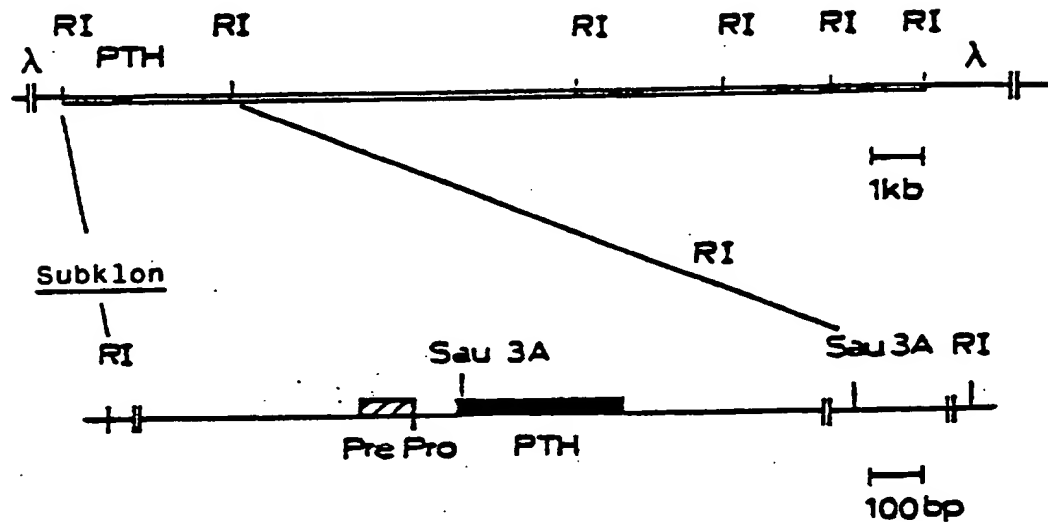
0139076

- 12 -

Schema 3:

Klonierungsschema für eine Human-PTH-Genexpression in
E. coli

1) Lambda-Humanhybrid



DNA-Sequenz innerhalb dieses mit RI herausgeschnittenen
Bereichs: (folgendes Blatt)

0139076

TGCTTTAGTTTACTCAGCATCAGCTACTAACATACCTGAACGAAGATCTTGTTCTAAGA
ACAGAAATCAAATGAGTCGTAAGTCGATGATTGTATGGACTTGCTTCTAGAACAAGATTCT

CATTGTAT
GTAACATA

Intron II ca. 400 bp

				Met	Ile	Pro	Ala	Lys	Asp	Met	Ala	Lys	Val	Met
GTG	AAG	ATG	ATA	CCT	GCA	AAA	GAC	ATG	GCT	AAA	GTT	ATG		
CAC	TTC	TAC	TAT	GGA	CGT	TTT	CTG	TAC	CGA	TTT	CAA	TAC		

Ile	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Cys	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Asp	Gly	Lys
ATT	GTC	ATG	TTG	GCA	ATT	TGT	TTT	CTT	ACA	AAA	TCG	GAT	GGG	AAA
TAA	CAG	TAC	AAC	CGT	TAA	ACA	AAA	GAA	TGT	TTT	AGC	CTA	CCC	TTT

Ser Val Lys
TCT GTT AAG
AGA CAA TTC

Intron I ca. 80 bp		Lys	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn
	AAG	AGA	TCT	GTG	AGT	GAA	ATA	CAG	CTT	ATG	CAT	AAC	
	TTC	TCT	AGA	CAC	TCA	CTT	TAT	GTC	GAA	TAC	GTA	TTG	

Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn	Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg
CTG	GGA	AAA	CAT	CTG	AAC	TCG	ATG	GAG	AGA	GTA	GAA	TGG	CTG	CGT
GAC	CCT	TTT	GTA	GAC	TTG	AGC	TAC	CTC	TCT	CAT	CTT	ACC	GAC	GCA

Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro
AAG	AAG	CTG	CAG	GAT	GTG	CAC	AAT	TTT	GTT	GCC	CTT	GGA	GCT	CCT
TTC	TTC	GAC	GTC	CTA	CAC	GTG	TTA	AAA	CAA	CGG	GAA	CCT	CGA	GGA

Leu	Ala	Pro	Arg	Asp	Ala	Gly	Ser	Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Lys	Glu
CTA	GCT	CCC	AGA	GAT	GCT	GGT	TCC	CAG	AGG	CCC	CGA	AAA	AAG	GAA
GAT	CGA	GGG	TCT	CTA	CGA	CCA	AGG	GTC	TCC	GGG	GCT	TTT	TTT	CTT

Asp	Asn	Val	Leu	Val	Glu	Ser	His	Glu	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Ala
GAC	AAT	GTC	TTG	GTT	GAG	AGC	CAT	GAA	AAA	AGT	CTT	GGA	GAG	GCA
CTG	TTA	CAG	AAC	CAA	CTC	TCG	GTA	CTT	TTT	TCA	GAA	CCT	CTC	CGT

Asp	Lys	Ala	Asp	Val	Asn	Val	Leu	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	Gln	
GAC	AAA	GCT	GAT	GTG	AAT	GTA	TTA	ACT	AAA	GCT	AAA	TCC	CAG	TGA
CTG	TTT	CGA	CTA	CAC	TTA	CAT	AAT	TGA	TTT	CGA	TTT	AGG	GTC	ACT

AAA	TGA	AAA	CAG	ATA	TTG	TCA	GAG	TTT	TGC	TCT	AGA	CAG	TGT	AGG
TTT	ACT	TTT	GTC	TAT	AAC	AGT	CTC	AAG	ACG	AGA	TCT	GTC	ACA	TCC

GCA	ACA	ATA	CAT	GCT	GCT	AAT	TCA	AAG	CTC	TAT	TAA	GAT	TTT	CAA
CGT	TGT	TAT	GTA	CGA	CGA	TTA	AGT	TTT	GAG	ATA	ATT	CTA	AAG	GTT

GTG	CCA	ATA	TTT	CTG	ATA	TAA	CAA	ACT	ACA	TGT	AAT	CCA	TCA	CTA
CAC	GGT	TAT	AAA	GAC	TAT	ATT	GTT	TGA	TGT	ACA	TTA	GGT	AGT	GAT

GCC	ATG	ATA	ACT	GCA	ATT	TTA	ATT	GAT	TAT	TCT	GAT	TCC	ACT	TTT
CGG	TAC	TAT	TGA	CGT	TAA	AAT	TAA	CTA	ATA	AGA	CTA	AGG	TGA	AAA

ATT	CAT	TTG	AGT	TAT	TTT	AAT	TAT	CTT	TTT	TAT	TGT	TTA	TTT	TTT
TAA	GTA	AAC	TCA	ATA	AAA	TTA	ATA	GAA	AAG	ATA	ACA	AAT	AAG	AAA

TTA	AAG	TAT	GTT	ATT	GCA	TAA	TTT	ATA	AAA	GAA	TAA	AAT	TCG	ACT
AAT	TTT	ATA	CAA	TAA	CGT	ATT	AAA	TAT	TTT	CTT	ATT	TTA	AGC	TGA

TTT	AAA	CCT	CTC	TTT	TAC	CTT	AAA	ATG	TAA	AAC	AAA	AAT	GTA	ATG
AAA	TTT	GGA	GAG	AAG	ATG	GAA	TTT	TAC	ATT	TTG	TTT	TTA	CAT	TAC

ATC	ATA	AGT	CTA	AAT	AAA	TGA	AGT	ATT	TCT	CAC	TCA	AA		
TAG	TAT	TCA	GAT	TTA	TTT	ACT	TCA	TAA	AGA	GTG	AGT	TT		

----- Prä-Pro

----- PTH

0139076

- 14 -

2) erneuter Schnitt (Sau 3A)

<u>Intron</u>	<u>Lys</u>
G AGGAG AAGA	
CTCCTCTTCTCTAG	

<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	<u>Val</u>
GATCTGTG.....		
ACAC.....		

3) Auffüllen mit dG und dA

<u>Ser</u>	<u>Val</u>
GATCTGTG.....	
AGACAC.....	

4) Abbau mit S1-Nuklease

<u>Ser</u>	<u>Val</u>
TCTGTG.....	
AGACAC.....	

5) Ligation mit DNA-Adaptor

<u>Met</u>	<u>Ser</u>	<u>Val</u>
CATCGATG	TCTGTG.....	
GTAGCTAC	AGACAC.....	

6) erneuter Schnitt (ClaI)

<u>Met</u>	<u>Ser</u>	<u>Val</u>
CGATGTCTGTG.....		
TACAGACAC.....		

0139076

- 15 -

- 7) Subklonieren in die ClaI-Spaltstelle von pBR322 und erneuter Schnitt (HindIII)

ClaI Met Ser Val
 AGCTTCATCGATGTCGTG.....
 AGTAGCTACAGACAC.....

- 8) verschiedene Auffüllreaktionen

Met
 TCATCGATG.....
 AGTAGCTAC.....

Met
 TTCATCGATG.....
 AAGTAGCTAC.....

Met
 CTTTCATCGATG.....
 GAAGTAGCTAC.....

Met
 GCTTCATCGATG.....
 CGAAGTAGCTAC.....

Met
 AGCTTCATCGATG.....
 TCGAAGTAGCTAC.....

0139076

- 16 -

9) Ligation mit DNA-Adaptoren (2 identischen Linkern)

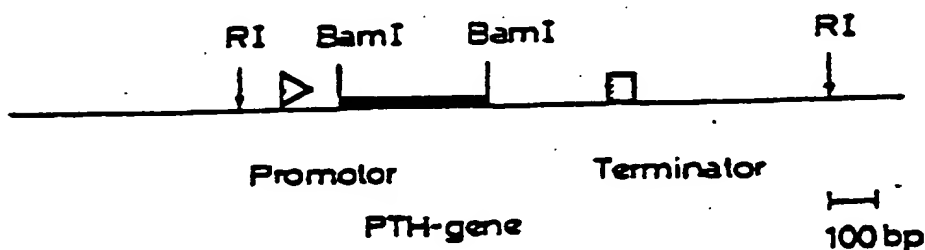
BamI
Met Ser Val

TCCCTAGGGAT	CCCTAGGGAGCTT	CATCGATGTCTGTG.....
AGGGATCCCT	AGGGATCCCT	CGAAGTAGCTACAGACAC.....

10) erneuter Schnitt (BamI)

Stop RS
Met Ser Val

GATCCCTAG	GGAG	CTT	CATCGATGTCTGTG.....
GGATC	CCCTC	GAAGTAGCTACAGACAC.....	

11) Insertion in ein Plasmid nach einem starken Promotor

BOETERS, BAUER & PARTNER**PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS****THOMAS-WIMMER-RING 14
D-8000 MÜNCHEN 22****0139076****PAO BOETERS, BAUER & PARTNER
THOMAS-WIMMER-RING 14, D-8000 MÜNCHEN 22****-17-****DIPLOM-DR. HANS D. BOETERS
DIPLOM-ROBERT BAUER
MÜNCHEN****DIPLOM-VINCENZ v. RAFFAY
DIPLOM-DR. THOMAS FLECK
HAMBURG****TELEFON: (089) 22 00 92****TELEX: 5 24 576 rmb****TELEGRAMME: PROVENTION, MÜNCHEN****Änderungen**

1. Seite 1 Zeilen 1 bis 2 sollen lauten: "Human-Parathyroidhormon (Human-PTH) produzierende Hybridvektoren, Human-Parathyroidhormongen, eukaryotische Zellen mit dem Hybridvektor und deren Verwendung.

2. Seite 1 Zeile 4 und fortlaufend in den Anmeldungsunterlagen: "Human-Parathyroidhormon" statt "Human-Parathormon".

3. Seite 1 Zeile 5 soll lauten: "Calcium in Knochen. Die Wirkungen und Funktionen von Human-Parathyroidhormon und seinen Agonisten und Antagonisten werden von Dambacher, Praktische Osteologie, Thieme Verlag Stuttgart / New York 1982; Reeve et al, British Medical J. 1340 (1980) 1 - 11; und Potts et al, Advances in Protein Chemistry 35 (1982) 323 - 395 beschrieben.

4. Seite 4 Zeile 4 lautet: "klonieren lassen. Einzelheiten

0139076

- 18 -

zum Klonieren und zur Expression von Genen unter der Steuerung von E.-coli-Promotoren beispielsweise in Streptomyces lassen sich bei Chater, Nature 299 (1982) 10 ff finden. Insbesondere kommt Escherichia coli in Be-".

5. Seite 7 Zeilen 3 bis 4 lauten: "Tierzellen, insbesondere Wirbeltierzellen, beispielsweise Froschzellen (vgl. Wickens et al, Nature 285 (1980) 628 bis 634), Säugetierzellen, Affenzellen, z.B. Affennierenzellen und Humanzellen."

6. Seite 7 Zeile 19 ist der folgende neue Absatz einzusetzen: "Schließlich betrifft die Erfindung

- eukaryotische Zellen, wie Tierzellen, insbesondere Wirbeltierzellen, wie Froschzellen, Säugetierzellen, Affenzellen und Humanzellen, die Human-Parathyroidhormon mit dem Hybridvektor gemäß den Ansprüchen 5, 6, 7 oder 8 produzieren, und
- die Verwendung der vorstehend angeführten Zellen bei Organismen mit mangelhaften Wirkungen und Funktionen des Parathyroidhormons, beispielsweise bei Säugetieren, insbesondere Menschen.

Bezüglich der Wirkungen und Funktionen eines spezifischen Parathyroidhormons in Organismen verschiedener Spezies wird auf Goltzman et al, Pept. Chem. Struct. Biol., Proc. Am. Pept. Symp. 4th, 1975, p. 571 - 577, 574, verwiesen.

Die im Detail angegebene DNA-Sequenz (Anspruch 1; Anspruch 5 = Schema 2; Schema 1) kann durch DNA-Sequenzen ersetzt werden, deren Einzelstränge sich mit den Einzelsträngen der im Detail angegebenen DNA-Sequenz hybridisieren lassen. Ferner kann jedes Basentriplett durch ein Synonym ersetzt werden."

0139076

-14-

7. Seite 5 Zeile 12: "Human-Parathyroidhormongen" anstelle von "Human-Parathormon".
8. Seiten 6, 11, 13 und 20: "Intron II ca. 4 000 bp" anstelle von "Intron II ca. 400 bp"; und "Intron I 103 bp" anstelle "Intron I ca. 80 bp".
9. Seite 8 drittletzte Zeile: "entgegengesetzten Uhrzeigersinn" statt "Uhrzeigersinn".
10. Seite 9 Zeile 10: "tac, T5" statt "tac T5".
11. Seite 5 Zeilen 12 bis 13 und Seite 19 Zeilen 28 bis 29: "(g) das ermittelte Human-Parathyroidhormongen (die DNA-Sequenz zwischen den EcoRI-Schnittstellen gemäß (B)) isoliert und in einen Expressionshybridvektor überführt, der in eukaryotischen Zellen kloniert werden kann,"
12. Seite 5 Zeile 15, Seite 7 Zeile 11, Seite 8 Zeile 14 und Seite 19 Zeile 30: "EcoRI-Schnittstellen" statt "RI-Schnittstellen".
13. Seite 5 letzte Zeile und Seite 19 Zeilen 32 bis 33: "EcoRI-Schnittstellen liegenden DNA-Sequenz aufweist, insbesondere einen Unterbereich, der Human-Parathyroidhormon oder dessen Agonisten oder Antagonisten exprimiert:" statt "RI-Schnittstellen liegenden DNA-Sequenz /aufweist/:".
14. Seite 1 Zeilen 17 bis 21 und Anspruch 1 Zeilen 10 bis 13 sollen lauten: "(b) gegebenenfalls einen sich an den Promotor anschließenden DNA-Bereich von 1 bis 1000 oder 1 bis 200 Basenpaaren, (c) eine ribosomale Bindungsstelle, die sich an den DNA-Bereich gemäß (b) oder, sofern (b) fehlt, an den Promotor gemäß (a) anschließt,".

0139078

-20-

15. Seite 4 Zeile 32: "hybridisiert" statt "anlagert".

16. Entfällt.

17. Seite 7 Zeilen 28 bis 29 lauten: "Aus den erhaltenen Hybridklonen wurden die Hybrid-Plasmid-DNAs isoliert und in ihrer Einzelstrangform an einen Träger fixiert. Aus den Nebenschilddrüsen isolierte mRNA wurde mit fixierter Einzelstrang-DNA hybridisiert und entfernt und in".

18. Seite 7 Zeile 34: "und DNA-Sequenzanalyse konnten" statt "konnten".

19. Seite 8 Zeile 2: "ne-cDNA-Parathyroidhormongen" statt "ne-Parathormongen".

20. Seite 8 Zeile 17 soll lauten: "klease Sau3A der Prä-Pro-Teil des PTH-Gens vom Gen"

21. Seite 8 Zeile 16: "(2)" zu streichen.

22. Seite 8 Zeile 18: "getrennt (2)". statt "getrennt. (3)".

23. Seite 8 Zeile 20: "(3) und" statt "und (4)".

24. Seite 8 Zeilen 24, 29 und 33: ". (5)", ". (6 bis 7)" und ". (8)" werden "(4).", "(5)." bzw. "(7).".

25. Seite 8 Zeile 32: "pBR322 (6 bis 7) gegen den Uhrzeigersinn" statt "pBR322 im Uhrzeigersinn".

26. Seite 9 Zeile 4: "(8)." statt ". (9)".

0139076

-21-

27. Seite 9 Zeile 6: "/TCCCTAGGGA/ (9)." statt "/TCCCTAGGGA/ .".

28. Seite 9 Zeile 9: "BamHI-Spaltstelle (10)" statt "BamHI-Spaltstelle".

29. Seite 9 Zeile 11: "geeignet (11)" statt "geeignet".

30. Seite 8 Zeile 30: "PTH-Genfragment" statt "PTH-Fragment".

31. Seite 9 Zeile 13: "Die transformierten E." statt "Die E..".

32. Seite 9 Zeilen 24 bis 25: "Antikörper (spezifisch zu PTH-Fragmenten AS1-34, AS28-48 und AS48-68) wirksam" statt "Antikörper 1-34, 28-48 und 48-68 wirksam".

33. Seite 9 Zeile 31 soll lauten: "wurde PTH durch Extraktion gewonnen; es war im RIA positiv gegen Antikörper (spezifisch zu den PTH-Fragmenten AS28-48 und AS44-68)."

34. Seite 16: "RI" bedeutet "EcoRI", "BamI" bedeutet "BamHI" und "RS" bedeutet "ribosomale Bindungsstelle".

35. Die folgenden Ansprüche 3 bis 4 sind hinzuzufügen:

"3. Hybridvektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 (f) durch eine DNA-Sequenz ersetzt ist, deren Einzelstränge mit den Einzelsträngen der spezifischen DNA-Sequenz hybridisiert werden können, wobei die ersetzende DNA-Sequenz gewünschte Produkte exprimieren kann.

0139076

- 22 -

4. Hybridvektor nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Basentriplets durch Synonyme ersetzt sind."

35. Der bisherige Anspruch 3 wird Anspruch 5.

36. Auf Seite 21 sollen die bisherigen Ansprüche 4 bis 8 durch die folgenden Ansprüche ersetzt werden:

"6. Hybridvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß er in Tierzellen, insbesondere Wirbeltierzellen, Säugetierzellen, Affenzellen, beispielsweise Affennierenzellen und Humanzellen klonierbar ist.

7. Hybridvektor nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische DNA-Sequenz gemäß Anspruch 5 (B) durch eine DNA-Sequenz ersetzt ist, deren Einzelstränge sich mit den Einzelsträngen der spezifischen DNA-Sequenz hybridisieren lassen, wobei die ersetzende DNA-Sequenz gewünschte Produkte exprimieren kann.

8. Hybridvektor nach Anspruch 5, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Basentriplets durch Synonyme ersetzt sind.

9. Human-Parathyroidhormongen:

- (a) herstellbar gemäß Anspruch 5 (A) und
- (b) gekennzeichnet durch die zwischen zwei EcoRI-Schnittstellen liegende DNA-Sequenz gemäß Anspruch 5 (B) oder einen Unterbereich davon.

0139076

- 25 -

10. Eukaryotische Zellen, insbesondere Tierzellen, beispielsweise Wirbeltierzellen, Säugetierzellen, Affenzellen und Humanzellen, die Human-Parathyroidhormon mit dem Hybridvektor gemäß Anspruch 5, 6, 7 oder 8 produzieren.

11. Verwendung der Zellen gemäß Anspruch 10 für Organismen (beispielsweise Säugetiere, insbesondere Menschen) mit Parathyroid-Mangelwirkungen oder Parathyroid-Mangelfunktionen."

- 1 -

BOETERS, BAUER & PARTNER
PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
THOMAS-WIMMER-RING 14
D-8000 MÜNCHEN 22

0139076

PAa BOETERS, BAUER & PARTNER
THOMAS-WIMMER-RING 14, D-8000 MÜNCHEN 22

DPL-CHEM. DR. HANS D. BOETERS
DPL-ING. ROBERT BAUER
MÜNCHEN

DPL-ING. VINCENTZ v. RAFFAY
DPL-CHEM. DR. THOMAS FLECK
HAMBURG

TELEFON: (089) 22 78 87

TELEX: 5 24 878 rtm

TELEGRAMME: PROVENTION, MÜNCHEN

Patentansprüche

- 5 1. In prokaryotischen Zellen klonierbarer und Human-Parathormon produzierender Hybridvektor, g e k e n n z e i c h -
n e t durch folgende Merkmale:
- (a) einen Promotor,
 - 10 (b) einen sich an den Promotor anschließenden DNA-Bereich von
0 bis 1000 oder 0 bis 200 Basenpaaren,
 - (c) eine sich an den DNA-Bereich gemäß (b) anschließende ribo-
somale Bindungsstelle,
 - (d) einen sich an die ribosomale Bindungsstelle anschließen-
15 den DNA-Bereich von 4 bis 15 Basenpaaren,
 - (e) ein sich an den DNA-Bereich gemäß (d) anschließendes
Startkodon und
 - (f) die folgende Human-Parathormon kodierende DNA-Sequenz:

20

.. 0139076

- 2 -

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
TCT GTG AGT GAA ATA CAG CTT ATG CAT AAC CTG GGA AAA CAT
AGA CAC TCA CTT TAT GTC GAA TAC GTA TTG GAC CCT TTT GTA

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
CTG AAC TCG ATG GAG AGA GTA GAA TGG CTG CGT AAG AAG CTG
GAC TTG AGC TAC CTC TCT CAT CTT ACC GAC GCA TTC TTC GAC

Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala
CAG GAT GTG CAC AAT TTT GTT GCC CTT GGA GCT CCT CTA GCT
GTC CTA CAC GTG TTA AAA CAA CGG GAA CCT CGA GGA GAT CGA

Pro Arg Asp Ala Gly Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp
CCC AGA GAT GCT GGT TCC CAG AGG CCC CGA AAA AAG GAA GAC
GGG TCT CTA CGA CCA AGG GTC TCC GGG GCT TTT TTC CTT CTG

Asn Val Leu Val Glu Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala
AAT GTC TTG GTT GAG AGC CAT GAA AAA AGT CTT GGA GAG GCA
TTA CAG AAC CAA CTC TCG GTA CTT TTT TCA GAA CCT CTC CGT

Asp Lys Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys Ala Lys Ser Gln
GAC AAA GCT GAT GTG AAT GTA TTA ACT AAA GCT AAA TCC CAG T
CTG TTT CGA CTA CAC TTA CAT AAT TGA TTT CGA TTT AGG GTC A

0139076

- 3 -

2. Hybridvektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet -
zeichnend, daß er in E. coli klonierbar ist.
3. In eukaryotischen Zellen klonierbarer und Human-Parathor-
mon produzierender Hybridvektor,
(A) dadurch herstellbar, daß man
(a) aus Schweine-Nebenschilddrüsen mRNA isoliert,
(b) die isolierte mRNA als ds-cDNA mit Hilfe eines Vektors
in E. coli kloniert,
(c) aus Pools erhaltener Klone Hybridvektor-DNA isoliert,
(d) isolierte Hybridvektor-DNA an einem für jeden Pool eigen-
en Träger fixiert, gemäß (a) isolierte mRNA anlagert und
wieder entfernt, entfernte mRNA in Schweine-Parathormon zu
Übersetzen versucht, gebildetes Schweine-Parathormon durch
Antikörperfällung nachweist und damit gemäß (b) erhaltene
Klone ermittelt, die Schweine-Parathormongen-Sequenzen auf-
weisen, Hybridvektor-DNA ermittelter und Schweine-Parathormon-
gen-Sequenzen aufweisende Klone sequenziert und den oder die
Klone identifiziert, die Hybridvektor-DNA mit Schweine-Parat-
hormon kodierender DNA-Sequenz aufweisen,
(e) Hybridvektor-DNA der gemäß (d) identifizierten Klone
radioaktiv markiert,
(f) mit erhaltener radioaktiv markierter Hybridvektor-DNA
eine Human-Genbank screenen und
(g) das ermittelte Human-Parathormongen in einen in eukaryo-
tischen Zellen klonierbaren Hybridvektor überführt,
(B) und gekennzeichnet durch eine zwischen zwei RI-Schnitt-
stellen liegende DNA-Sequenz, die die folgende DNA-Sequenz
umfaßt, oder einen Unterbereich der zwischen den RI-Schnitt-
stellen liegenden DNA-Sequenz:

0139076

TGTCCTTTAGTTTACTCAGCATCAGCTACTAACATACCTGAACGAAGATCTTGTCTAAGA
ACAGAAATCAAATGAGTCGTAAGTCGATGATTGTATGGACTTGCTTCTAGAACAAGATTCT

CATTGTAT
GTAACATA

Intron II ca. 400 bp

				Met	Ile	Pro	Ala	Lys	Asp	Met	Ala	Lys	Val	Met
	GTG	AAG	ATG	ATA	CCT	GCA	AAA	GAC	ATG	GCT	AAA	GTT	ATG	
	CAC	TTC	TAC	TAT	GGA	CGT	TTT	CTG	TAC	CGA	TTT	CAA	TAC	

Ile	Val	Met	Leu	Ala	Ile	Cys	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Asp	Gly	Lys
ATT	GTC	ATG	TTG	GCA	ATT	TGT	TTT	CTT	ACA	AAA	TCG	GAT	GGG	AAA
TAA	CAG	TAC	AAC	CGT	TAA	ACA	AAA	GAA	TGT	TTT	AGC	CTA	CCC	TTT

Ser Val Lys
TCT GTT AAG
AGA CAA TTC

Intron I		Lys	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn
ca. 30 bp	AAG	AGA	TCT	GTG	AGT	GAA	ATA	CAG	CTT	ATG	CAT	AAC	
	TTC	TCT	AGA	CAC	TCA	CTT	TAT	GTC	GAA	TAC	GTA	TTG	

Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn	Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg
CTG	GGA	AAA	CAT	CTG	AAC	TCG	ATG	GAG	AGA	GTA	GAA	TGG	CTG	CGT
GAC	CCT	TTT	GTA	GAC	TTG	AGC	TAC	CTC	TCT	CAT	CTT	ACC	GAC	GCA

Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro
AAG	AAG	CTG	CAG	GAT	GTG	CAC	AAT	TTT	GTT	GCC	CTT	GGA	GCT	CCT
TTC	TTC	GAC	GTC	CTA	CAC	GTG	TTA	AAA	CAA	CGG	GAA	CCT	CGA	GGA

Leu	Ala	Pro	Arg	Asp	Ala	Gly	Ser	Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Lys	Glu
CTA	GCT	CCC	AGA	GAT	GCT	GGT	TCC	CAG	AGG	CCC	CGA	AAA	AAG	GAA
GAT	CGA	GGG	TCT	CTA	CGA	CCA	AGG	GTC	TCC	GGG	GCT	TTT	TTC	CTT

Asp	Asn	Val	Leu	Val	Glu	Ser	His	Glu	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Ala
GAC	AAT	GTC	TTG	GTT	GAG	AGC	CAT	GAA	AAA	AGT	CTT	GGA	GAG	GCA
CTG	TTA	CAG	AAC	CAA	CTC	TCG	GTA	CTT	TTT	TCA	GAA	CCT	CTC	CGT

Asp	Lys	Ala	Asp	Val	Asn	Val	Leu	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	Gln
GAC	AAA	GCT	GAT	GTG	AAT	GTA	TTA	ACT	AAA	GCT	AAA	TCC	CAG
CTG	TTT	CGA	CTA	CAC	TTA	CAT	AAT	TGA	TTT	CGA	TTT	AGG	GTC

AAA	TGA	AAA	CAG	ATA	TTG	TCA	GAG	TTC	TGC	TCT	AGA	CAG	TGT	AGG
TTT	ACT	TTT	GTC	TAT	AAC	AGT	CTC	AAG	ACG	AGA	TCT	GTC	ACA	TCC

GCA	ACA	ATA	CAT	GCT	GCT	AAT	TCA	AAG	CTC	TAT	TAA	GAT	TTC	CAA
CGT	TGT	TAT	GTA	CGA	CGA	TTA	AGT	TTC	GAG	ATA	ATT	CTA	AAG	GTT

GTG	CCA	ATA	TTT	CTG	ATA	TAA	CAA	ACT	ACA	TGT	AAT	CCA	TCA	CTA
CAC	GGT	TAT	AAA	GAC	TAT	ATT	GTT	TGA	TGT	ACA	TTA	GGT	AGT	GAT

GCC	ATG	ATA	ACT	GCA	ATT	TTA	ATT	GAT	TAT	TCT	GAT	TCC	ACT	TTT
CGG	TAC	TAT	TGA	CGT	TAA	AAT	TAA	CTA	ATA	AGA	CTA	AGG	TGA	AAA

ATT	CAT	TTG	AGT	TAT	TTT	AAT	TAT	CTT	TTC	TAT	TGT	TTA	TTC	TTT
TAA	GTA	AAC	TCA	ATA	AAA	TTA	ATA	GAA	AAG	ATA	ACA	AAT	AAG	AAA

TTA	AAG	TAT	GTT	ATT	GCA	TAA	TTT	ATA	AAA	GAA	TAA	AAT	TCG	ACT
AAT	TTC	ATA	CAA	TAA	CGT	ATT	AAA	TAT	TTT	CTT	ATT	TTA	AGC	TGA

TTT	AAA	CCT	CTC	TTC	TAC	CTT	AAA	ATG	TAA	AAC	AAA	AAT	GTA	ATG
AAA	TTT	GGA	GAG	AAG	ATG	GAA	TTT	TAC	ATT	TTG	TTT	TTA	CAT	TAC

ATC	ATA	AGT	CTA	AAT	AAA	TGA	AGT	ATT	TCT	CAC	TCA	AA
TAG	TAT	TCA	GAT	TTA	TTT	ACT	TCA	TAA	AGA	GTG	AGT	TT

0139078

- 5 -

4. Hybridvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er in Humanzellen oder Affenzellen, wie Affennierenzellen, klonierbar ist.

5. Human-Parathormongen,

(a) herstellbar gemäß Anspruch 3 (A) und

(b) gekennzeichnet durch die zwischen zwei RI-Schnittstellen liegende DNA-Sequenz gemäß Anspruch 3 (B) oder einen Unterbereich davon.

6. Human-Parathormongen nach Anspruch 5, gekennzeichnet durch direkte Klonierbarkeit in Humanzellen oder Affenzellen.

7. Eukaryotische Zellen, insbesondere Tierzellen (wie Affenzellen) und Humanzellen, die mit dem Human-Parathormongen gemäß Anspruch 6 oder 7 Human-Parathormon produzieren.

8. Verwendung der Zellen gemäß Anspruch 7 zum Einsatz bei parathormondefekten Lebewesen (wie Menschen).